

Juulia Saarinen

# GENEETTISEN LEIMAUTUMISEN JA LEIMAUTUMISEN HÄIRIÖIDEN VAIKUTUS IHMISESSÄ

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Kandidaatintyö  
Toukokuu 2022

# TIIVISTELMÄ

Juulia Saarinen: Geneettisen leimautumisen ja leimautumisen häiriöiden vaikutus ihmisessä  
Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Bioteknologia ja biolääketieteen tekniikka  
Toukokuu 2022

---

Geneettinen leimautuminen on epigeneettinen ilmiö, joka tarkoittaa geenien ilmenemisen riippumista siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peritty. Työn tarkoituksena on selvittää leimautumisen toimintaperiaate ja vaikutus ihmisen eri prosesseihin, leimautumisen häiriöiden syyt ja seuraukset ja selvittää, voiko keinohedelmöitys lisätä leimautumisen häiriöistä johtuvien sairauksien riskiä verrattuna spontaanisti hedelmöitettyyn lapseen.

Geneettisessä leimautumisessa leimautuneet geenit hiljennetään aikuisen alkuitusoluissa riippuen henkilön sukupuolesta. Näin ollen geeni ilmenee jälkeläisessä vain toiselta vanhemmalta perittyinä. Hiljentämistä hallitsevat eri epigeneettiset säätelyjärjestelmät, joista vahvimpana toimii metylaatio. Leimautumisen mekanismit ovat eristyselementti- ja ei-koodaava RNA -välitteinen mekanismi. Mekanismin tehtävänä on hiljentää geenin luentaa. Mekanismin tulee olla sellainen, että leima pysyy yksilössä mitoottisten ja meioottisten solunjakautumisten sekä hedelmöityksen läpi aikuisen alkuitusoluihin asti muuttumattomana. Epigeneettisistä säätelyjärjestelmistä metylaatio on ominaisuuksiltaan sellainen, että se pystyy toimimaan geneettisenä leimana.

Ihmisellä leimautumista tarvitaan tasapainoiseen kehitykseen jo ennen syntymää sekä kasvuun, kehitykseen ja hermoston toimintaan syntymän jälkeen. Leimautumisen häiriöt ovat laaja joukko kromosomien, geenien ja epigenomin mutaatioita, jotka aiheuttavat leimautumisen toimintaan häiriön. Häiriön seurauksena leimautunut geeni hiljenee täysin, tai leima häviää ja geeni ilmenee molemmista alleeleista saattaen aiheuttaa haitallista yli-ilmenemistä. Häiriöiden seuraukset voivat olla vakavat. Ne aiheuttavat raskauksien keskenmenoja sekä erilaisia leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia. Yleisimpiä leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia ovat Angelmanin, Prader-Willin, Russell-Silverin, sekä Beckwith-Wiedemannin oireyhtymät. Niitä yhdistävät erilaiset kasvuun ja kehitykseen liittyvät häiriöt.

Spontaaniin mutaatioiden lisäksi on havaittu, että myös hedelmöityshoitojen olosuhteet saattavat johtaa häiriöihin leimautumisessa. Keinohedelmöitys tapahtuu spontaaniin hedelmöitykseen verrattuna hyvin erilaisessa ympäristössä. Tämän ympäristön olosuhteet voivat vaikuttaa yksilön epigenomiin, joka muodostuu hyvin nopeasti hedelmöityksen demetylaatioaallon jälkeen. On todettu, että kasvatustilastoilta usein puuttuvat kriittiset aminohapot sekä alkion maljalla kohtaama oksidatiivinen stressi altistavat alkion epigenomissa tapahtuviin, leimautumista häiritseviin mutaatioihin.

Hedelmöityshoidoilla alkunsa saaneilla lapsilla on suurempi todennäköisyys sairastua Beckwith-Wiedemannin oireyhtymään kuin spontaanisti hedelmöitettyillä lapsilla. Muihin leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin ei ole löytynyt yhtä vahvaa yhteyttä keinohedelmöitystä ja spontaania hedelmöitystä verratessa. Kyseessä on kuitenkin suhteellisen uusi teknologia ja hyvin harvinaiset sairaudet, joten tämänhetkinen tieto aiheesta on melko suppeaa. Hedelmöityshoidoissa tulevan äidin ja syntävä lapsen turvallisuus tulisi aina mennä muun edelle.

Avainsanat: Geneettinen leimautuminen, metylaatio, leimautumisen häiriöt, hedelmöityshoidot

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1. JOHDANTO.....</b>	<b>4</b>	
<b>2. GENEETTISEN LEIMAUTUMISEN TOIMINTA JA VAIKUTUS YKSILÖÖN .....</b>	<b>5</b>	
2.1 Leimautumisen epigenetiikka .....	5	
2.2 Leimautumisen mekanismi ja leiman synty ja ylläpito.....	8	
2.3 Leimautuneiden geenien tehtävät ja vaikutus yksilössä .....	11	
<b>3. GENEETTISEN LEIMAUTUMISEN HÄIRIÖT.....</b>	<b>14</b>	
3.1 Häiriötyypit.....	14	
3.1.1 Kromosomien rakenteen poikkeavuudet .....	15	
3.1.2 Uniparentaalinen disomia .....	16	
3.1.3 Leimautumiskeskuksen mutaatio .....	17	
3.1.4 Epimutaatiot ja intrageeniset mutaatiot .....	17	
3.2 Häiriöiden vaikutus yksilöön.....	18	
3.3 Leimautumisen häiriöistä johtuvat sairaudet.....	18	
<b>4. HEDELMÖITYSHOIDOT JA LEIMAUTUMINEN .....</b>	<b>20</b>	
4.1 Hedelmöityshoidot .....	20	
4.2 Hedelmöitysympäristön vaikutus epigenomiin .....	21	
4.3 Hedelmöityshoitojen yhteys leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin		23
<b>5. YHTEENVETO .....</b>	<b>25</b>	
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>26</b>	

# LYHENTEET JA MERKINNÄT

AS	Angelmanin oireyhtymä
BWS	Beckwith-Wiedemannin oireyhtymä
CpG	Sytosiini-fosfaatti-guaaniini-emäspari
DMR	Eri tavalla metyloitu alue (engl. Differentially methylated region)
DNMT	Metyylitransferaasi
gDMR	Sukusoluissa eri lailla metyloitu alue, gameettinen DMR
ICR	Geneettinen leima, leimautumiskeskus
ICSI	Koeputkihedelmoitys, jossa käytetään mikroinjektiota (engl. Intra Cytoplasmic Sperm Injection)
ID	Leimautumisen häiriöstä johtuva sairaus (engl. Imprinting disorder)
IVF	Koeputkihedelmoitys, jossa sukusolut parituvat maljalla (engl. In Vitro Fertilization)
lncRNA	Pitkä ei-koodaava RNA
LOI	Leiman häviämien (engl. Loss of imprint)
miRNA	Mikro RNA
ncRNA	Ei-koodaava RNA
PWS	Prader-Willin-oireyhtymä
RSS	Russell-Silverin oireyhtymä
UPD	Uniparentaalinen disomia

# 1. JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on perehtyä geenien leimautumisen toimintaan, leimautumisen häiriöihin ja näistä häiriöistä aiheutuviin kehityshäiriöihin, sekä pohtia, kuinka hedelmöityshoidot vaikuttavat geneettiseen leimautumiseen. Koska geenien leimautuminen on epigeneettinen ilmiö, työssä selvitetään tarkemmin, mitä epigenetiikka tarkoittaa, ja mitä yksi sen hyvin vahvasti leimautumiseen liittyvä ja tätä ilmiötä aiheuttava osa-alue, metylaatio, tarkoittaa.

Diploidisissa soluissa suurin osa geenistä löytyy kahtena kopiona, isältä ja äidiltä perittyinä, joista molemmat alleelit ovat aktiivisia. Välillä on kuitenkin tarkoituksenmukaista, että toinen vastingeneistä ilmenee ja toinen on hiljennetty. Tästä on istukallisilla nisäkkäillä ja pussieläimillä kaksi esimerkkiä: geneettinen leimautuminen ja X-kromosomin inaktivaatio. Näissä tapauksissa geenistä ilmenee vain toinen alleeli. Geneettisestä leimautumisesta puhutaan, kun vastingeenin hiljeneminen on järjestelmällistä ja riippuu siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peritty. (Horsthemke 2014)

Leimautuminen syntyi istukallisten nisäkkäiden evoluutiona aikana, kun istukalliset nisäkkäät erkanivat munimalla lisääntyvistä nisäkkäistä. Ilmiö on liitetty vahvasti nisäkkään lisääntymisstrategian evoluutioon. Eri teorat ovat kiistelleet leimautumisen synnyn syistä. Näistä konfliktihypoteesi on tähän mennessä tunnetuin ja hyväksytyin hypoteesi. Se selittää ilmiötä uroksen ja naaraan erilaisiin intresseihin mahdollisimman tehokkaaseen lisääntymiseen. Isän geenit pyrkivät tuottamaan mahdollisimman vahvoja jälkeläisiä, kun taas äidin geenit pyrkivät säästämään ja jakamaan resursseja tasaisesti useita poikueita varten. Konfliktiteoriaa puoltaa ensimmäisten leimautuneiden geenien joukossa löydetty IGF2, joka säätelee ravinnon siirtymistä istukan ja äidin välillä. (Renfree ym. 2009)

Geneettisellä leimautumisella on tärkeä rooli alkion varhaisen kasvun ja kehityksen tasapainottamisessa. Lisäksi sen häiriöt ovat syy tiettyjen perinnöllisten sairauksien patogeneesissä eli taudin synnyssä. Kun toinen geeni on hiljentynyt, mutaatiot aktiivisessa geenissä aiheuttavat herkästi kehityshäiriöitä, kun niiden vajaata toimintaa ei ole paikkaamassa toinen, toimiva alleeli. Leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia tunnetaan useampia, mutta niiden patogeneesi ei aina ole selvillä. Tästä syystä onkin pohdittu, voiko hedelmöityshoidot vaikuttaa leimautumiseen ja siten lisätä leimautumisen häiriöistä johtuvien sairauksien riskiä.

## 2. GENEETTISEN LEIMAUTUMISEN TOIMINTA JA VAIKUTUS YKSILÖÖN

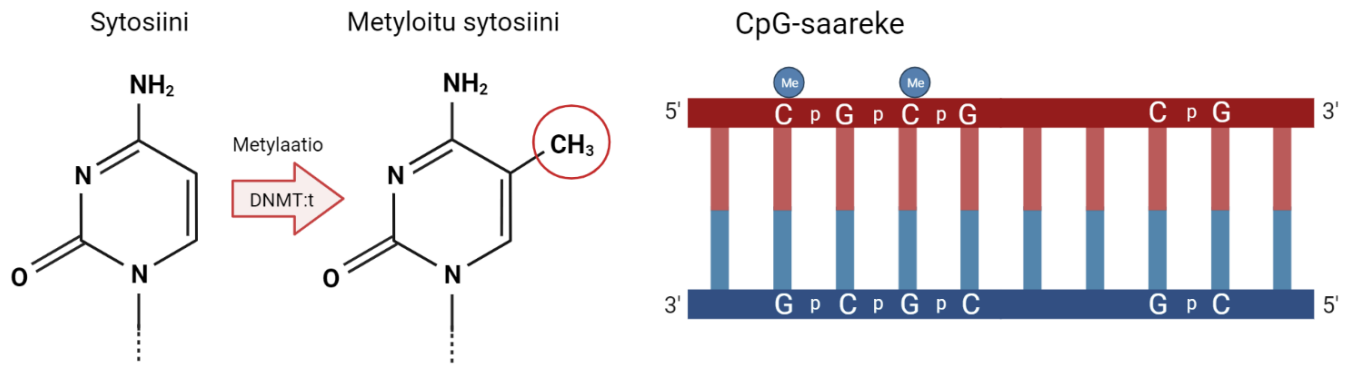
Geenien leimautuminen on yleinen epigeneettinen ilmiö, jossa yksilössä tiettyjen geenien ilmeneminen riippuu siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peritty. Geneettisesti leimautunut vastingeeni hiljenee, ja leimautumaton vastingeeni ilmenee. Tässä luvussa käsitellään epigeneettisiä säätelyjärjestelmiä geneettisen leimautumisen taustalla, leiman muodostumista ja ylläpitoa sekä leimautumisen vaikutusta ihmisen eri prosesseissa: alkion ja istukan kehityksessä, vastasyntyneen kasvussa ja kehityksessä sekä aivojen toiminnassa. (Barlow & Bartolomei 2014)

### 2.1 Leimautumisen epigenetiikka

Epigenetiikalla tarkoitetaan muutosta geenin toiminnassa solun tarpeiden mukaan ilman, että DNA:n emäsjärjestys muuttuu. Epigeneettiset muutokset periytyvät tytärsolulle solunjakautumisessa, mutta niitä on myös mahdollista ohjelmoida soluun kokonaan uudestaan. Epigeneettinen muovautuminen on voimakkainta varhaisen sikiönkehityksen aikana, kun solut erilaistuvat eri kudoksiksi. Ihmisen genomien epigeneettisiä säätelyjärjestelmiä ovat metylaatio, histonimodifikaatiot ja ei-koodaavat RNA:t. (Aittomäki ym. 2016, s. 82)

Geneettisten leimojen on todistettu ilmenevän tapauksissa, joissa kromosomit ovat keskenään täysin identtiset. Tämä tarkoittaa sitä, että leimautumisen mekanismi on epigeneettisten säätelyjärjestelmien tulosta eivätkä leimat muuta DNA-sekvenssiä. Geneettisessä leimautumisessa geenien ilmentymistä säädellään epigeneettisesti kahdesta vastingeenistä vain toisessa sen alkuperän mukaan. Eniten tutkittu ja parhaiten tunnettu epigeneettisen säätelyn muoto on DNA:n metylaatio, ja sillä on todistettu olevan suuri merkitys geneettisen leiman syntymisessä ja ylläpidossa. Se ei kuitenkaan ole ainoa leimautumiseen vaikuttava mekanismi, vaan myös histonimodifikaatioilla ja pitkillä ei-koodaavilla RNA:illa uskotaan olevan vaikutusta ilmiöön. (Barlow & Bartolomei, 2014)

DNA-metylaatio tarkoittaa metyyliryhmän (-CH<sub>3</sub>) liittämistä kovalenttisella sidoksella DNA:n sytosiininukleotidiin (lyhenne "C"), selkärankaisilla tarkemmin guaniininukleotidin (lyhenne "G") vieressä CpG-kohdassa sijaitsevaan sytosiininukleotidiin. CpG-kohta tarkoittaa sytosiini-fosfaatti-guaaniini-emäsparia, jossa DNA:n 5'-päästä 3'-pään suuntaan luettuna sytosiinia seuraa guaniini. Tällaisia ryhmittymiä on paljon DNA:n toistojaksoissa ja promoottorialueilla, ja niitä kutsutaan CpG-saarekkeiksi (engl. *CpG islands*, CGI). (Kuva 1). CpG-saarekkeesta puhutaan, kun alueen GC-% on yli 50% ja alue on yli 200 emäsparia pitkä. (Alberts ym. 2010, s.288)



**Kuva 1.** Sytosiinin rakenne ja metylaatio, sekä CpG-saarekkeen rakenne. Sytosiinit metyloitu-  
vat metyyli transferaasien vaikutuksesta, jolloin sytosiinin 5-hiileen liittyy metyyli. CpG-saarekkei-  
den sytosiinit ovat leimautuneessa geenissä usein metyloituneet. Tehty BioRenderillä, muokattu  
lähteestä (Alberts ym. 2010, s. 288)

Metyyli ryhmän liittämistä DNA:n edellä mainittuihin kohtiin vastaavat metyyli transferaasit (DNMT:t). Metyyli transferaaseja on erilaisia, ja niiden tehtävät eroavat toisistaan. Esimerkiksi DNMT1-metyyli transferaasi syntyy huolehtii metylaation säilymisestä solunjakautumisen yli, kun DNMT3A- ja DNMT3B-metyyli transferaasi syntyy vastaavat uusien metylaatioiden luomisesta. (Aittomäki ym. 2016 s. 82) Metylaation seurauksena metyloituneen sytosiinin kolmiulotteinen rakenne muuttuu niin, että transkriptiokoneiston tai transkriptiotekijöiden pääsy tai niiden kiinnittymisen alueelle estyy. Näin metylaatio vaikuttaa geenin luentaan repressiivisesti. Metyyli ryhmiä on myös mahdollista poistaa sytosiininukleotideista joko aktiivisella demetylaatiolla eri entsyymien toimesta tai passiivisella demetylaatiolla niin, että DNA:n replikaation ylläpitometylointi epäonnistuu. (Barlow & Bartolomei 2014)

Leimautumisen syntyyn ja säätelyyn vaikuttavat erityisesti eri tavalla metyloidyt alueet eli niin kutsutut DMR:t (engl. *differentially methylated regions*, DMRs). Näillä tarkoitetaan kahden eri alleelin välistä DNA-metylaation eroa. DMR:t voivat olla itsessään geneettinen leima, mikäli metylaatio muodostuu gametogeneesin eli sukusolujen muodostumisen aikana ja se pysyy paikallaan vielä somaattisissa soluissa. Tällöin puhutaan gameettisista DMR:istä, gDMR:istä (engl. *gametic DMRs*, gDMR). DMR:t voivat myös vaikuttaa leimautumisen aikaansaamaan alleelien hiljentämiseen, mikäli alue metyloidaan vasta, kun alkio on diploidi, ja tällöin kyseessä on somaattinen DMR (engl. *somatic DMRs*). (Barlow & Bartolomei 2014). Bartolomei ja Ferguson-Smith (2011) toteavat, että vain metylaatio täyttää kaikki tiukat vaatimukset, joita leiman muodostuminen ja ylläpito vaativat, ja on sen vuoksi suurin epigeneettinen geneettisen leimautumisen tekijä. Metylaation merkitykseen leimautumisen synnyssä ja ylläpidossa palataan tarkemmin seuraavassa luvussa.

Histonimodifikaatiot ovat toinen epigeneettisistä säätelyjärjestelmistä. Histonit ovat proteiineja, jotka pakkaavat DNA:ta tiiviimmäksi kromatiiniksi, jonka yksikkö on nukleosomi. Kukin nukleosomi

koostuu neljästä eri histoniproteiiniparista (H2A, H2B, H3, H4), histoniparien ympärille kietoutuneesta DNA-juosteesta ja kokonaisuutta tukevasta histoniproteiinista H1. Kromatiinin tiiviys säätelee geenien aktiivisuutta. Löyhä kromatiini, eukromatiini, on aktiivisempaa ja tiivis kromatiini, heterokromatiini, epäaktiivisempaa. Pakkausaste vaikuttaa suoraan transkriptiotekijöiden pääsemiseen kromatiinin sisään, jotta luenta käynnistyy, ja siten solun kykyyn lukea geeniä transkriptiossa. Kromatiinin rakenteeseen vaikuttaa edellä esitelty DNA:n metylaatio, mutta myös histoneissa olevien häntien muokkaus. (Aittomäki ym. 2016, s. 82-83)

Histoneiden hännissä olevat aminohapot ovat usein kemiallisen muokkauksen kohteena translaation jälkeen. Muokausvaihtoehtoja ovat esimerkiksi häntien metylaatiot, asetylaatiot ja fosforylaatiot, jotka vaihtoehdosta riippuen joko aktivoivat tai hiljentävät geeniä. Histonihäntien muokkausta hoitavat eri entsyymit, esimerkiksi erilaiset metyyli- ja asetyyli transferaasit. Kromatiinin avoimuutta voidaan eri entsyymien avulla muuttaa tarvittaessa nopeastikin tarvittavan aktivaatiotilan mukaan. (Aittomäki ym. 2016, s. 82). Tätä kromatiinin rakenteeseen vaikuttavaa histonin hännän muokkausta kutsutaan histonimodifikaatioksi. Histonimodifikaatiot ovat toinen todennäköinen perimän leimautumisen aiheuttaja, sillä ne voisivat täyttää samat geneettisen leimautumisen vaatimukset kromatiinin aktiivisuuteen vaikuttamalla kuin metylaatiokin. Niiden roolin uskotaan olevan kuitenkin metylaatiota pienempi, ja niitä on tutkittu huomattavasti vähemmän. (Barlow & Bartolomei 2014)

Kolmas epigeneettinen säätelyjärjestelmä on ei-koodaavat RNA:t (engl. *non-coding RNA*, ncRNA). Suurin osa ihmisen RNA:ista on ei-koodaavia RNA:ita. Ne ovat joukko erilaisia RNA:ita, joiden pohjalta ei synny proteiinituotetta. Näitä ovat esimerkiksi pitkät ei-koodaavat RNA:t (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) sekä erilaiset pienet RNA:t, kuten mikro-RNA:t (miRNA). Kukin näistä on erikoistunut omiin säätelytehtäviinsä. Pitkät, ei-koodaavat RNA:t ovat yli 200 nukleotidia pitkiä, ja niillä on lukuisia erilaisia tehtäviä. Tehtäviin kuuluu esimerkiksi proteiineja koodaavien geenien transkription säätely, joka käytännössä hiljentää geenin luentaa kromatiinia muokaten, lähetti-RNA:han kohdistuva transkription jälkeinen säätely ja DNA:n eheydestä huolehtiminen. (Statello ym. 2022)

Pienet, noin 20–30 nukleotidia pitkät, ei-koodaavat miRNA:t säätelevät kohdegeeniensä aktiivisuutta sitoutumalla näiden koodaavien lähetti-RNA-molekyylien emäsjärjestykseltään täysin tai osittain komplementaariseen kohtaan saaden aikaan niin kutsutun hiljennyskompleksin (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC). Hiljennyskompleksin avulla kyseinen lähetti-RNA tunnistetaan ja vaihtoehtoisesti joko hajotetaan tai translaatio estetään. (Aittomäki ym. 2016, s. 83-84)

Barlow ja Bartolomei (2014) toteavat kaksi syytä, miksi lncRNA voi vaikuttaa leimautumiseen. Ensinnäkin lncRNA:t osoittavat yleensä vastavuoroista vanhemmille spesifistä ilmentymistä verrat-



tuna leimautuneihin, lähetti-RNA:ta koodaaviin geeneihin. Toiseksi DMR:t, jotka kantavat gameettista metylaatiota ja siten säätelevät leimautumista, limittyvät lncRNA:iden promoottorialueiden kanssa hyvin usein. Samassa yhteydessä lyhyiden ei-koodaavien RNA:iden on todettu osallistuvan leimautuneiden geenien hiljentämiseen.

Epigeneettisille muutoksille on tunnusomaista niiden mitoottinen periytyminen tytärsolulle solunjakautumisen yhteydessä. Meioottinen periytyminen ei ole epigeneettisillä muutoksilla yleistä, sillä alkio käy hedelmöityshetken jälkeen läpi koko genomin laajuisen uudelleenohjelmoinnin, jossa tällaiset muutokset pyritään poistamaan. (Aittomäki ym. 2016, s. 84). Tästä syystä geneettistä leimautumista voidaan pitää ihmisen epigeneettisen säätelyn erikoistapauksena, jossa muutokset pysyvät soluissa meioosin ja hedelmöityksen läpi. DNA:n metylaatio on pääosassa leiman muodostumisessa ja sen ylläpidossa. Histonimodifikaatioilla ja ncRNA:illa voi olla vaikutusta leimautumisessa, mutta niiden vaikutusta ilmiöön on vähemmän tutkittu kuin metylaation. Vaikka vain toinen vastinalleeli leimautuneista geeneistä ilmenee, tulee muistaa, ettei geneettinen leimautuminen ole välttämättä vain geenejä hiljentävä prosessi, vaan se voi säädellä geenien ilmentymistä muillakin tavoin, jotta geenien ilmentymiselle aiheutuu vanhempainkohtaisia eroja. (Barlow & Bartolomei 2014)

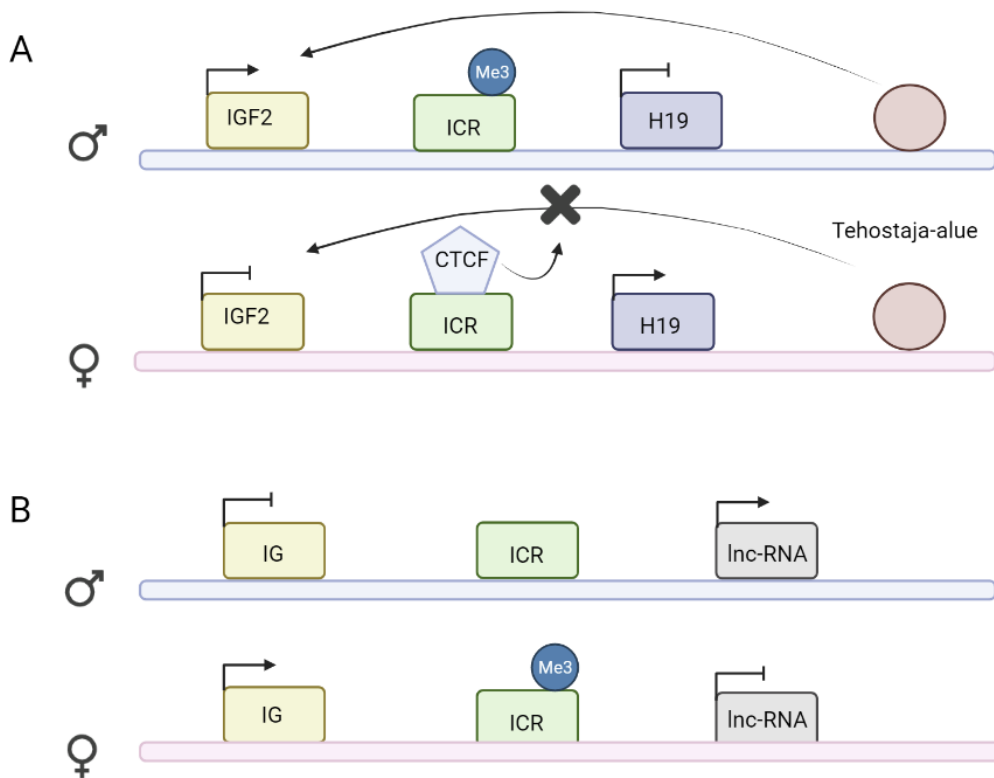
## 2.2 Leimautumisen mekanismi ja leiman synty ja ylläpito

Geenien leimautuminen tarkoittaa geenin hiljentämistä pohjautuen siihen, onko geeni peritty maternaalisesti eli äidiltä vai paternaalisesti eli isältä. Tässä luvussa perehdytään leiman mekanismiin ja toimintaan, sen syntyyn embryogeneesin aikana, ylläpysymiseen meioottisen ja mitoottisten solunjakautumisten yli ja siirtymiseen yksilöstä toiseen.

Geneettinen leima, ICR (engl. *Imprinting control region*), on intergeeninen tai promoottorialueella sijaitseva, cis-toimiva, eri tavalla muokattu epigeneettinen alue, joka aikaansaa joko yksittäisten geenien tai geeniklusterien hiljenemistä. Cis-toimivat alueet vaikuttavat diploidisissa soluissa geenin ilmentymiseen vain toisessa kromosomaalisessa alleelissa, kun taas trans-toimivat alueet vaikuttavat molempiin alleeleihin samalla tavalla. Geeniklustereilla tarkoitetaan useamman geenin mittaista, saman säätelyalueen alaisuudessa toimivien geenien kokonaisuutta. (Barlow & Bartolomei 2014). Sukusoluissa gDMR:t voivat toimia geneettisinä leimoina. Kuten aiemmassa luvussa kerrottiin, nämä alueet ovat eri lailla metyloidut toisessa sukusolussa, ja metylaatio säilyy sukusolujen yhdistyessä vain yksilön toisessa kromosomissa. Klustereiden ja gDMR:ien toimintaa on tutkittu hiirillä poistamalla gDMR alueesta, ja siten hävittämällä leima. Näin saatiin todistettua, että gameettiset DMR:t toimivat ICR:inä. (Barlow & Bartolomei 2014).

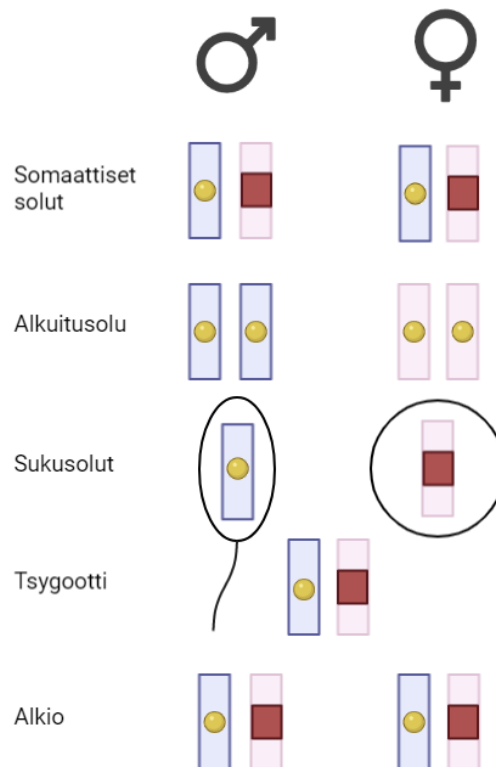
ICR:t muuttavat geeniklusterien geenien ilmenemistä säätelevien elementtien aktiivisuutta. Geneettisen leimautumisen mekanismi on cis-toimiva, joko eristyselementtivälitteinen tai ei-koodaava

RNA -välitteinen. Mekanismeja on havainnollistettu kuvassa 2. Eristyselementtivälitteisissä mekanismeissa (kuva 2 A) metyloimaton ICR sitoo proteiinin, tarkemmin CTCF-proteiinin, ja muodostaa näin niin kutsutun eristeen. Tämä eriste estää geenin tehostaja-alueita aktivoimasta sen jälkeen tulevia genejä. Tehostaja-alueet vuorovaikuttavat transkriptiokoneiston kanssa ja lisäävät geenin transkriptiota. Vastakkainen, metyloitu ICR ei metylaation vuoksi kykene sitomaan CTCF-proteiinia ja muodostamaan eristettä, jolloin siinä kromosomissa olevat, ICR:n jälkeen tulevat geenit ovat tehostaja-alueiden saavutettavissa ja siten ilmenevät tässä kromosomista. Ei-koodaava RNA -välitteisissä mekanismeissa (kuva 2 B) metyloitu ICR sisältää lncRNA:n promoottorialueen, joka on suoraan hiljennetty DMR:n avulla. Tämän kromosomin, jossa lncRNA:n promoottorialue on metylaatiolla hiljennetty, geenit ilmenevät. Kromosomissa, jossa promoottorialue toimii, geenit hiljenevät. (Lewis & Reik 2006; Barlow & Bartolomei 2014)



**Kuva 2.** Leimautumisen mekanismit. Kuvassa on havainnollistettu leimautumisen kahta eri mekanismia, eristyselementtivälitteistä (A) ja ei-koodaava RNA -välitteistä (B) yhden kromosomiparin avulla. A kuvaa eristyselementtivälitteistä mekanismia, jossa metyloituun leimautumiskeskuksen sitoutuva CTCF-proteiini vaikuttaa alueen geenien ilmenemisen säätelyyn. Tällä mekanismilla kuvassa esiintyvät, paljon tutkitut leimautuneet geenit IGF2 ja H19 hiljenevät. B kuvaa lncRNA-välitteistä mekanismia, jossa leimautumiskeskuksen yhteydessä sijaitseva lncRNA:n promoottorialue säätelee geenien ilmenemistä. Tehty BioRenderillä, muokattu lähteistä (Barlow & Bartolomei 2014; Kim ym. 2015).

Tumansiirtotekniikan mahdollistamien hiirikokeiden ja identifioitujen, leimautuneiden geenien pohjalta on tultu seuraaviin geneettistä leimautumista koskevaan tutkimustuloksiin: leimautumisen syklisiin kuuluu tietyt vaiheet, jotka mekanismin tulee pystyä toteuttamaan. Ensimmäinen vaihe leimautumisen syklissä on leiman laittaminen sukusoluun jo embryogeneesin aikana, kun äidiltä ja isältä perityt kromosomit ovat erillään, ja sen tulee pysyä samassa kromosomissa muuttumattomana läpi hedelmöityksen ja alkion varhaisten demetylaatioaaltojen. Leiman tulee olla somaattisissa soluissa periytyvä niin, että tieto vanhemman alkuperästä säilyy mitoottisen solunjakautumisen yli, ja leiman pitää pystyä vaikuttamaan geenien transkriptioon. Syklissä viimeisenä leima tulee voida poistaa uusista kehittyvistä sukusoluista, jotta se voidaan ohjelmoida sukusoluihin uudelleen puhtaalta pöydältä. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011; Barlow & Bartolomei 2014). Leimautumisen synnyn ja ylläpidon vaiheet esitellään kuvassa 3. Näitä voidaan kutsua leimautumisen mekanismin peruspilareiksi, joista jokainen tulee toteuttaa leimautumisen mekanismin avulla. Epigeneettisistä säätelyjärjestelmistä DNA:n metylaatio kykenee toteuttamaan kaikki kohdat, ja sen on siksi tutkittu toimivan leimana (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011).



**Kuva 3.** Leiman synty ja ylläpito. Kuvassa on havainnollistettu leiman ylläpitoa yksilöltä toiselle maternaalisesti leimautuvan geenin avulla. Selvyyden vuoksi kuvassa on vain yksi homologinen kromosomipari. Sininen kromosomi kuvaa paternaalisesti perittyä ja vaaleanpunainen maternaalisesti perittyä kromosomia. Keltainen piste kuvaa paternaalisesti ilmenevää alleelia ja tummanpunainen neliö kuvaa hiljentynyttä maternaalista leimaa. Sekä miehellä että naisella leimautuminen toimii samalla tavalla. Leima puretaan molempien sukupuolten alkuitusoluista ja leimataan uudelleen samaan kohtaan, jonka sukupuolelle leima kuuluu. Näin leima periytyy oikein yksilön sukusoluihin ja uuteen tsygoottiin. Leimautuminen on yhtäläistä sekä miehellä että naisella. Tehty BioRenderillä, muokattu lähteestä (Horsthemke 2014)

Gametogeneesiin ja varhaisen embryogeneesiin aikana epigenomi uudelleenohjelmoidaan globaalisti kaksi kertaa. Gametogeneesiin aikaisessa uudelleenohjelmoinnissa alkuitusoluista poistetaan metylaatiot, jonka jälkeen sukusolut täydennetään uudelleen sukupuolispesifisillä metylaatioilla, leimoilla. (Zeng & Chen 2019). Geneettisen leiman tulee syntyä haploidiseen sukusoluun, kun sukusolut ovat erillään. Tämä on ainoa hetki, kun perimän alkuperä on vielä eroteltavissa isän ja äidin perimäksi, sillä epigeneettiset säätelyjärjestelmät eivät voi hedelmöityksen jälkeen erottaa perimän alkuperää. Maternaalisesti metyloidut gDMR:t metyloidaan munasolujen kasvun aikana ja paternaalisesti metyloidut DMR:t metyloidaan prospermatogonian aikana. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011)

Hedelmöityksen jälkeen embryogeneesiin uudelleenohjelmoinnissa solujen erilaistumiseen liittyvät metylaatiot puretaan ja genomi resetoidaan pluripotentiksi genomiksi, jotta alkiossa on mahdollista tuottaa kaikkia solutyyppisiä. (Zeng & Chen 2019). Yhdistelmä cis-toimivia sekvenssejä ja transvaikuttavia tekijöitä antavat gDMR:ille suojan embryogeneesiin demetylaatiota vastaan ja siten ylläpitävät leimoja läpi epigenomin demetylaatioaaltojen. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Tämän jälkeen leima periytyy diploidisiin, somaattisiin soluihin. Leiman periytymisestä somaattisissa soluissa vastaa DNA:n metylaatiota ylläpitävät entsyymit. DNA metyylitransferaasi 1 (DNMT1) toimii metylaation ylläpitävänä tekijänä, joka tunnistaa vastareplikoidun DNA:n ja metyloi uudet, metyloimattomat CpG-alueet. (Aittomäki ym. 2016 s. 82)

Metylaatio tulee voida poistaa, jotta se voidaan asettaa uudelleen sukusoluihin ilman, että aikaisemmat metylaatiot vaikuttavat siihen. Metylaatiot voidaan poistaa passiivisella demetylaatiolla, jossa ylläpitometylaatio epäonnistuu, tai demetyloivan toiminnan kautta. Tällaisia demetyloivia toimintoja ovat esimerkiksi eri demetyloivat entsyymit. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Tällä monimutkaisella ja tarkoin säädellyllä mekanismilla yksilön kromosomit leimautuvat ja leima siirtyy muuttumattomana yksilöstä toiseen.

### **2.3 Leimautuneiden geenien tehtävät ja vaikutus yksilössä**

Leimautumisen olemassaolon osoitukseksi ja sen käyttäytymisen tutkimiseksi on tehty paljon hiirikokeita. Ensimmäisissä geneettistä leimautumista tutkineissa hiirikokeissa havaittiin, että maternaalinen ja paternaalinen genomi eivät toimi tasapainoisesti. Suuri askel eteenpäin oli tumansiirtotekniikan kehittyminen ja sen avulla tehdyt tutkimukset, joissa saatiin luotua uniparentaali diploidia siten, että molemmissa sukusoluissa on identtinen perimä. Tekniikalla luotiin gynogeneettisiä alkioita (kaksi maternaalista genomia) ja androgeneettisiä alkioita (kaksi paternaalista alkioita). Kumpikaan näistä ei tuottanut elinkelpoisia ja hedelmällisiä jälkeläisiä, toisin kuin alkioit, jotka rekonstruoidiin yhdestä maternaalisesta ja yhdestä paternaalisesta esitumasta. Gynogeneettiset alkioit olivat viallisia alkion ulkopuolisten osien kehityksessä, ja androgeneettiset alkioit olivat viallisia alkion kudosten kehityksessä. Näin todistettiin 1980-luvulla, kuinka alkion kehitys vaatii äidin genomissa

ilmentyviä, isän puolella leimautuneita geenejä ja alkion ulkopuoleisten osien kehitys vaatii isän genomissa ilmentyviä, äidin puolella leimautuneita geenejä. Tällöin perustettiin pohja nisäkkäiden geneettisen leimautumisen olemassaololle ja tarpeellisuudelle. Ilmiö saatiin todistettua, kun onnistuttiin löytämään ja identifioimaan geenejä, jotka ilmenevät spesifisti riippuen siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peritty. Ensimmäiset löydetyt leimautuneet geenit olivat *IGF2* ja *H19*, ja ne onnistuttiin identifioimaan vuonna 1991. (Barlow & Bartolomei 2014).

Jo ensimmäisissä leimautumista tutkivissa hiirikokeissa nähtiin, kuinka leimautuneiden geenien vaikutus alkion ja alkion ulkopuolisten osien kasvuun ja kehitykseen on suuri. Nykyään voidaan todeta leimautuneiden geenien vaikuttavan laajasti ihmisen eri prosesseissa. Näkyvimpiä prosesseja ovat kuitenkin edelleen istukan, alkion ja vastasyntyneen kasvu ja kehitys (Barlow & Bartolomei 2014). Näiden lisäksi leimautumisen on todettu vaikuttavan mm. aivojen normaaliin toimintaan, tiettyjen solulinjojen kehitykseen ja synnytyksen jälkeisen energian homeostaasiin. Koska leimautuminen on monoalleelinen, monimutkaisesti säädelty ilmiö, leimautuneiden geenien vaikutus on kytkeytynyt vaihteluun niiden ilmentymisen asteessa. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Ilmeneminen on myös hyvin kudosspesifiä – leimautuneet geenit ilmenevät laajasti monissa kudoksissa, mutta erityisen paljon istukan ja aivojen kudoksissa. Kuitenkin useat tietyssä kudoksessa ilmenevät leimautuneet geenit ilmenevät myös useissa muissa kudoksissa, ilmeneminen vain on eri asteista. (Wilkins 2008).

Ihmisellä on löydetty melkein 130 varmasti leimautunutta geeniä. Mikäli mukaan lasketaan geenit, joiden tällä hetkellä uskotaan olevan leimautuneita ilman, että sitä on onnistuttu todistamaan, on mahdollisten leimautuneiden geenien määrä ihmisellä yli 200. (Geneimprint, <https://www.geneimprint.com/site/home>. Viitattu: 4.3.2022). Toisin sanoen ihmisen kaikista geeneistä lähes prosentti on todennäköisesti leimautuneita, joten ei ole ihme, että leimautumisen vaikutus näkyy yksilössä laajasti. Ihmisellä leimautuneita geenejä löytyy eniten kromosomeista 7, 11, 15 ja 20. Leimautuneiden geenien toiminta voidaan jakaa synnytystä edeltävien ja synnytyksen jälkeisten prosessien toiminnan vaikutukseen. Ennen synnytystä leimautuneet geenit vaikuttavat hyvin vahvasti sikiön ja istukan kasvuun ja kehitykseen. Synnytyksen jälkeen ne hiljenevät ja toiset leimautuneet geenit alkavat ilmetä vaikuttaen aivojen toimintaan ja muihin solulinjoihin. (Wilkins 2008)

Ensimmäisiä leimautuneiksi geeneiksi määrittäjä geenejä ovat *IGF2* ja *H19*. Maternaalisesti leimautunut *IGF2* koodaa insuliinin kaltaista kasvutekijä 2:sta (engl. *insulin like growth factor 2*), jolla on keskeinen tehtävä prenataalisessa kasvussa ja kehityksessä. Kyseinen proteiini edistää solujen somaattista kasvua ja erilaistumista useissa kudoksissa. Syntymän jälkeen geenin ilmeneminen vähenee. Paternaalisesti leimautunut *H19* taas koodaa proteiinin sijaan ei-koodaavaa RNA:ta. Tämän ncRNA:n toiminta ei ole vielä tarkasti selvillä, mutta sen uskotaan toimivan tuumorisuppressorina, eli hillitsevän solujen kasvua ja jakautumista. Myös *H19* on *IGF2*:n tapaan aktiivisena ennen syntymää laajasti eri kudoksissa, ja ilmeneminen vähentyy syntymän jälkeen. Molemmat geenit

sijaitsevat samassa, kromosomin 11 p-käsivarren geeniklusterissa ja ne jakavat yhteisen leimautumiskeskukseen. Näiden geenien leimautumisen mekanismi on esitetty aiemmassa luvussa. Kyseisen geenilokuksen leimautumisen häiriöt aiheuttavat joitain tunnettuja leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia, joita käydään läpi myöhemmin. (MedicinePlus, <https://medlineplus.gov/>. Viitattu 14.4.2022)

*IGF2* yhdessä sen vastakkaisesti leimautuneen *IGFR2*-geenin kanssa loivat todisteet konfliktihypoteesin puolesta. (Tycko & Morison 2002). Leimautuneet geenit vaikuttavat eniten istukan ja alkion kasvuun ja kehitykseen. Leimautuneiden geenien päätehtävä istukassa on säädellä ravinteiden kulkua istukan ja sikiön välillä. Ravinteiden kuljetus määräytyy sikiön ja istukan kysynnän mukaan, jotka molemmat kuluttavat äidin voimavaroja. Tämä saatiin selville, kun tutkittiin maternaalisesti leimautunutta *IGFR2*-geeniä (*insulin-like growth receptor 2 gene*). (John 2017)

Aivoissa maternaalisesti leimautuneet eli paternaalisesti ilmenevät geenit vaikuttavat hypotalamuksessa ja paternaalisesti leimautuneet geenit ilmenevät ja vaikuttavat aivojen neokortikaalisessa osassa. Leimautuneet geenit vaikuttavat aivoissa alkion aivojen kehityksen lisäksi aikuisen ihmisen käyttäytymiseen. Esimerkiksi maternaalisesti leimautunut geeni *NDN* vaikuttaa neurokehityksen aikana ja sillä on suora vaikutus neuronaaliseen kasvuun. Leimautuneet geenit aivoissa ovat osana aineenvaihduntaa säätelevissä prosesseissa, esimerkiksi kontrolloiden energiankulutusta. Ne myös liittyvät vahvasti äidille raskausaikana syntyvään hoivaviettiin, jotka muuttavat ja valmistavat äidin käyttäytymistä jälkeläisiään kohtaan. Yleisesti leimautuneet geenit aivoissa yhdistetään erilaisiin käyttäytymiseen, oppimiseen ja kehitykseen liittyviin prosesseihin. (Wilkins 2008)

Vaikka geenien leimautuminen korostuu alkion ja istukan kehityksessä, vaikuttaa ilmiö myös muiden elinten kehitykseen. Esimerkiksi geeni *CDKN1C* ilmenee voimakkaasti monissa somaattisissa kudoksissa niiden kehityksen aikana. Näihin kudoksiin on tutkittu kuuluvan mm. lihaskudos, keuhkot, munuaiset ja silmät. *CDKN1C*:n normaali ilmentyminen liittyy solusyklin päättymiseen ja häiriintyneet *CDKN1C*-tasot ovat johtaneet puutteisiin elinten koossa. (Barlow & Bartolomei 2014). Yleisesti voidaan todeta, että maternaalisesti leimautuneet geenit edistävät jälkeläisten kasvua kohdussa tai syntymän jälkeen, ja paternaalisesti leimautuneet geenit hillitsevät kasvua. Tämä juontaa juurensa leimautumisen mekanismin syntyyn, konfliktiteoriaan, jossa leimautuminen pyrkii varjelemaan äidin resursseja mutta käyttämään isän resursseja. Leimautuneet geenit vaikuttavat joko yksilön kasvuun tai kehitykseen, tai sekä että. (Tycko & Morison 2002)

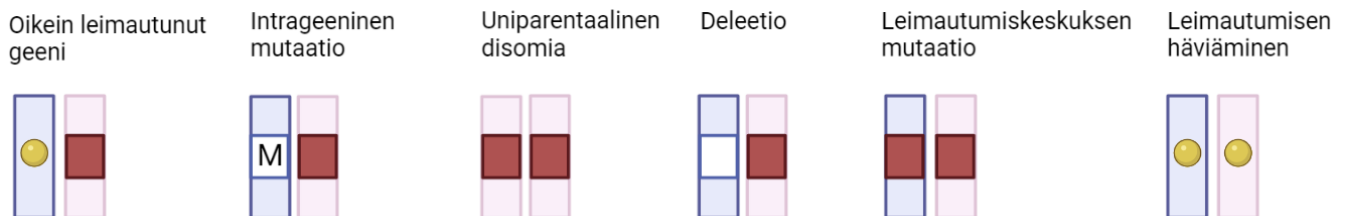
### 3. GENEETTISEN LEIMAUTUMISEN HÄIRIÖT

Leimautuminen on kriittinen osa varhaista yksilönkehitystä ja tärkeää geenien oikeanlaisen ilmenemisen kannalta. Koska leimautumisen seurauksena soluun jää vain yksi aktiivinen alleeli, geneettisten sairauksien riski kasvaa. Leimautumisen häiriöitä on erilaisia, mutta jokainen niistä johtaa leimautuneen geenin toimivan alleelin inaktivaatioon tai liikaekspressioon (Soellner ym. 2017). Leimautumisen häiriöiden oireet ihmisellä muistuttavat paljon häiriöiden oireita hiirillä, joilla häiriöitä on alun perin tutkittu. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Häiriöt leimautumisessa voivat johtaa vakaviin kehityshäiriöihin, keskenmenoihin tai leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin. Ihmisellä on Soellnerin (2017) mukaan löydetty 12 leimautumisen häiriöstä johtuvaa sairautta, ID:tä (engl. *imprinting disorders*, IDs), joiden tunnusomaisia piirteitä ovat mm. kasvuhäiriöt, käyttäytymisvaikeudet, henkinen kehitysvammaisuus, ongelmat syömiskäyttäytymisen ja verensokerin kanssa. (Soellner ym. 2017)

Tässä luvussa käydään läpi leimautumisen häiriöön johtavat geneettiset muutokset, muutosten vaikutukset yksilön kasvussa, kehityksessä ja toiminnassa ja joidenkin yleisimpien leimautumisen häiriöistä johtuvien sairauksien patogeneesit.

#### 3.1 Häiriötyypit

Geneettisen leimautumisen häiriöt voivat johtaa vakaviin kehityshäiriöihin. Leimautuminen voi häiriytyä eri tavoin, joista yleisimmät, sairauksiin johtavat häiriöt ovat kromosomien rakenteen poikkeavuudet, uniparentaalinen disomia, mutaatio leimautumiskeskuksessa, intrageeninen mutaatio leimautuneessa geenissä, epimutaatiot tai leimautumisen häviäminen (kuva 4) (Eggermann ym. 2015; Soellner ym. 2017). Eggermannin (2015) mukaan häiriöt leimautuneissa geeneissä voivat vaikuttaa geenien ilmentymiseen, säätelyyn ja syntyvän geenituotteen määrään.



**Kuva 4.** Geneettisen leimautumisen eri häiriötyypit. Häiriötyyppejä on havainnollistettu yhden kromosomiparin avulla. Sininen suorakulmio kuvaa paternaalista kromosomia, jossa geeni ilmenee normaalissa tilanteessa. Ilmenevää geeniä merkitään keltaisella ympyrällä. Vaaleanpunainen suorakulmio kuvaa maternaalista kromosomia, jossa geeni on leimautunut. Leimaa merkitään punaisella neliöllä. Mutaatiotyyppiejä on useita erilaisia. Niitä yhdistää kuitenkin se, että mutaation seurauksena normaalisti ilmenevä geeni ilmenee epätasapainoisesti. Tehty BioRenderillä, muokattu lähteestä (Horsthemke 2014).

Kuvassa 4 havainnollistettujen geneettisen leimautumisen häiriötyyppien toiminnallinen lopputulos on häiriön tyypistä riippumatta sama: leimautunut geeni ilmenee epätasapainoisesti, joko hiljentyen tai yli-ilmentyen. Kuitenkin yksilön fenotyyppinen lopputulos riippuu siitä, kumpaan alleeliin mutaatio vaikuttaa. Sama sairaus voi ilmetä montaa eri leimautumisen häiriön reittiä, eikä mikään häiriötyppi ole sidoksissa vain yhteen geneettisen leimautumisen häiriöstä johtuvaan sairauteen. (Eggermann ym. 2015; Soellner ym. 2017). Leimautumisen häiriöistä aiheutuva sairaus voi puhjeta myös ilman tiedettyä syytä (Aittomäki ym. 2016, s. 63).

### 3.1.1 Kromosomien rakenteen poikkeavuudet

Kromosomien rakenteen poikkeavuuksiksi kutsutaan niitä mutaatioita, jotka muuttavat yhden tai useamman kromosomin rakennetta. Niitä ovat deleetiot, translokaatiot, inversiot ja duplikaatiot. Yleensä vain kromosomirakenteen yli- tai alimäärällä on vaikutusta kantajansa terveyteen, ja sen pohjalta kromosomimuutokset voidaan luokitella tasapainottuneiksi ja tasapainottomiksi. Tasapainottuneet kromosomimutaatiot, kuten translokaatiot, inversiot ja duplikaatiot, eivät yleensä vaikuta geenin toimintaan, sillä kromosomi katkeaa harvoin keskeltä geeniä aiheuttaen ongelmaa geenin luennalle. Tasapainottomat kromosomimutaatiot, kuten deleetiot, taas vaikuttavat poikkeuksetta alueen geenien ilmenemiseen. (Aittomäki ym. 2016, s. 140). Erityisesti deleetioiden, mutta myös translokaatioiden ja duplikaatioiden on todettu aiheuttavan häiriöitä geenien leimautumiseen (Eggermann ym. 2015).

Deleetiot eli häviämät tarkoittavat kromosomimateriaalin puuttumista. Tämä johtaa kyseessä olevan alueen kopiokokoumäärän muutoksiin. Deleetio on terminaalinen, kun katkoskohtia on yksi ja kromosomilta on hävinnyt osa sen päästä, ja interstitiaalinen, kun katkoskohtia on kaksi ja alue on hävinnyt keskeltä kromosomia. Kohdassa, jossa toinen geeni ilmenee normaalisti ja toinen on leimalla hiljennetty, saattaa poistua normaalisti toimiva geeni deleetion myötä. Näin ollen kyseinen geeni ei ilmene lainkaan, jolloin seurauksena saattaa olla kehityshäiriöitä. (Aittomäki ym. 2016, s. 140). Leimautumisen monimutkaisen säätelyn vuoksi on myös mahdollista, että deleetio leimatulla alueella voi epäsuorasti aiheuttaa leimautuneen geenin yli-ilmenemistä. (Eggermann ym. 2015). Deleetioiden aiheuttamien oireiden luonne riippuu niistä kromosomialueista ja geneistä, jotka ovat hävinneet. Deleetiot ovat usein yksilöllä uusi mutaatio eivätkä perinnöllisesti syntyneitä. (Aittomäki ym. 2016, s. 140)

Translokaatiolla eli siirtymällä tarkoitetaan kahden eri kromosomien osien vaihtumista keskenään. Ne jaetaan resiprokaalisiin eli vastavuoroisiin ja sentrisiin eli Robertsonin translokaatioihin. Resiprokaalisissa translokaatioissa kromosomimateriaalin määrä pysyy samana, mutta kaksi kromosomia ovat vaihtaneet kromosomimateriaalia keskenään. Tämä ei yleensä aiheuta ongelmia kantajalleen, mutta huomioitavaa on, että tämän vuoksi meiosisin jako voi mennä sekaisin. Sentriset



translokaatiot tarkoittavat akrosentristen kromosomien liittymistä, jolloin ne muodostavat translokaatiokromosomin. Akrosentrisissä kromosomeissa kromosomin toinen käsivarsi on huomattavasti toista lyhyempi. Translokaatiot voivat häiritä kromosomien jakautumista meioosissa ja johtaa siten trisomiaan ja uniparentaalista disomiaa vastaavaan tilanteeseen, jossa translokaatiot päätyvät vaikuttamaan myös geenien leimautumiseen. (Aittomäki ym. 2016, s. 137–140)

Duplikaatiolla eli kahdentumalla tarkoitetaan kromosomin tietyn alueen monistumista, yleensä kahdentumista. Tämä johtaa kopiolumäärän muutoksiin aiheuttaen tämän kromosomin osittaista trisomiaa. Duplikaatioissa kahdentunut segmentti löytyy joko alkuperäisen vierestä kääntymättömänä, jolloin puhutaan tandemduplikaatiosta, tai kääntyneenä, jolloin puhutaan invertoituneesta duplikaatiosta. (Aittomäki ym. 2016, s. 140–141). Duplikaatio voi aiheuttaa leimautuneen geenin yliekspressiota, ja näin johtaa esimerkiksi Russell-Silverin oireyhtymän syntymään. (Eggermann ym. 2015; Aittomäki ym. 2016, s. 66). Inversiolla eli kääntymällä tarkoitetaan kromosomin osan kääntymistä yksittäisen kromosomin sisällä. Kääntyvä alue irtoaa ja palaa samaan kohtaan 180 astetta kääntyneenä. Tämä ei yleensä aiheuta kantajalleen oireita. (Aittomäki ym. 2016, s. 142–143)

### 3.1.2 Uniparentaalinen disomia

Uniparentaalinen disomia (engl. *uniparental disomy*, UPD) tarkoittaa tilaa, jossa molemmat kromosomit tai kromosomin osat on peritty samalta vanhemmalta. Kun uniparentaalinen disomia koskee vain osaa kromosomista, sitä kutsutaan segmentaaliseksi UPD:ksi (engl. *segmental UPD*). UPD voi olla joko synnynnäinen tai elämän aikana syntynyt, hankittu (Li ym. 2017). Synnynnäinen UPD on yleensä meioottisen häiriön tulos. Meioottisessa häiriössä tsygoottiin syntyy jonkin kromosomin trisomia, mutta virhe korjautuu ylimääräisen trisomisen kromosomin eliminoituessa jo varhaisen solunjakautumisen aikana. Kun korjauksen jälkeen jäljelle jää kromosomipari, joka on peräisin samalta vanhemmalta, on yksilöllä kyseisen kromosomin uniparentaalinen disomia.

Uniparentaalinen disomia voidaan jakaa uniparentaaliseksi heterodisomiaksi ja uniparentaaliksi isodisomiaksi, ja UPD:n tyyppi riippuu siitä, onko kromosomimutaatio syntynyt meioosin ensimmäisen jaon (anafaasi 1) vai toisen jaon (anafaasi 2) aikana tapahtuvan nondisjunktion vuoksi. Anafaasi 1:n nondisjunktion seurauksena tietyn kromosomin molemmat homologit periytyvät jälkeläiselle, jolloin näiden kromosomien geenisisältö ei ole identtinen. Anafaasi 2:n nondisjunktion seurauksena kromosomipari on homotsygootti sen sisältämien geenien suhteen. Tämän lisäksi UPD voi syntyä hedelmöityshetkellä toisen kromosomin ollessa disominen ja toisen nullisominen saman kromosomin suhteen. Nullisominen tarkoittaa, että toisen vanhemman kromosomi puuttuu kokonaan. (Aittomäki ym. 2016, s.68, 64-65, 135-136). Syntymän jälkeen UPD voi syntyä esimerkiksi kasvaimen muodostumisen aikana (Li ym. 2017).

Uniparentaalisen disomian vaikutukset riippuvat paljon siitä, mitä kromosomia tai sen osaa ilmiö koskee ja onko kromosomi peritty kaksinkertaisena isältä vai äidiltä. Näin ollen, jos UPD osuu kohtaan, jossa normaalisti toinen alleeli on leimautunut toimimattomaksi, UPD aikaansaa sen, että kriittinen, funktionaalinen alleeli puuttuu. Se voi myös aiheuttaa geenin yliekspressiota, mikäli kaksinkertaisena peritty kohta on leimautuneen geenin leimautumaton alleeli.

### 3.1.3 Leimautumiskeskuksen mutaatio

Leimana toimiva ICR on eri tavalla metyloitu alue, joka säätelee kohdegeeniensä aktiivisuutta. Mutaatio ICR-alueella johtaa joko leiman häviämiseen sieltä, missä sen kuuluisi olla, tai sen syntymiseen sinne, missä sen ei kuulu olla. Näin ollen mutaatio leimautumiskeskuksessa voi vaikuttaa geenilokuksen leimautumiseen siten, että leimautuminen tapahtuu kromosomissa ns. väärän sukupuolen mukaisesti. Tilanne voi johtaa geenin täydelliseen hiljenemiseen, tai leimautumisen häviämiseen eli LOI-tilaan (engl. *loss of imprinting*, LOI), jolloin geeni yliekspressoituu. (Aittomäki ym. 2016, s. 65). ICR-mutaatioiden tunnistaminen on kuitenkin vasta alkutekijöissä. Kehittyneemmällä ICR-mutaatioiden tutkimisella voitaisiin diagnosoida ja määrittää useampiakin leimautumisen häiriöistä aiheutuvia sairauksia. Jotta ICR-mutaatioista voitaisiin tietää enemmän, vaatisi se alueen tarkempaa tutkimista ja DNA-sekvensointia.

### 3.1.4 Epimutaatiot ja intrageeniset mutaatiot

Epimutaatio tarkoittaa aktiivisen geenin epänormaalia transkription repressiota tai repressoitujen geenien epänormaalia aktivaatiota, joka johtuu virheestä epigeneettisessä geenirepressiossa. Geneettisen leimautumisen häiriöistä puhuttaessa epimutaatiot vaikuttavat leiman eri tavoin metyloiduilla alueilla alueen metylaatioon tai histonien modifikaatioon. Epimutaatio voi olla seurausta DNA:n mutaatiosta cis- tai trans-vaikuttavassa tekijässä, jolloin puhutaan sekundaarisesta epimutaatiosta, tai epimutaatio voi tapahtua ilman DNA-sekvenssin muuttumista, jolloin puhutaan primaarisesta epimutaatiosta. Primaariset epimutaatiot ilmenevät yleensä hedelmöityksen jälkeen ja voivat johtaa somaattiseen mosaikismiin. (Eggermann ym. 2015; Soellner ym. 2017)

Intrageeniset alueet ovat koodaavaa DNA:ta. Mutaatiot näillä alueilla, eli leimautuneiden geenien funktionaalisisissa alleeleissa, ovat yksi syy leimautumisen häiriöille. Mutaatio voi saada aikaan geenin normaalin toiminnan muuttumista tai geenin hiljenemistä. Tällöin mutaatiot tietyissä leimautuneissa geeneissä voivat saada kriittisen alleelin hiljenemään, jolloin tilanne vastaa paljon esimerkiksi deletiota tai UPD:n tilannetta siinä, että geeniä ei voida lukea koska sitä joko ei ole tai se on mutaation vuoksi muuttunut lukukelvottomaksi. Mutaatio voi olla esimerkiksi pistemutaatio. (Soellner ym. 2017). Tietyille sairauksille on selvitetty tunnusomaisia leimautuneita geenejä, joiden hiljeneminen johtaa sairauden puhkeamiseen. (Aittomäki ym. 2016, s. 63–64)

## 3.2 Häiriöiden vaikutus yksilöön

Eläimillä ja ihmisillä diploidisuus toimii suojana resessiivisiä mutaatioita vastaan. Tiettyjen geenien, kuten leimautuneiden geenien kohdalla tämän menettäminen altistaa geenit haitallisille mutaatioille. Mutaatioiden seurauksena leimautuneiden geenien normaali toiminta häiriytyy, ja seurauksena saattaa olla keskenmenoja, vakavia kehityshäiriöitä tai leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia. Leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia kutsutaan yleisesti lyhenteellä ID:t (engl. *imprinting disorders*, IDs). Koska leimautuminen on yksilössä laajasti vaikuttava ilmiö, myös sen toiminnan häiriöllä on suuri vaikutus yksilön kehitykseen ja normaaliin toimintaan.

Luvussa 2.3 esitelty leimautumisen vaikutus yksilössä antaa jo kattavaa kuvaa siitä, mihin kaikkialle leimautumisen häiriöt yksilössä vaikuttavat – samoihin toimintoihin kuin normaalisti toimiva leimautuminenkin. Koska leimautuminen on vahvasti osana jo alkion kasvussa ja kehityksessä, on siinä tapahtuvat häiriöt kohtalokkaita alkionleimautumiselle. Esimerkiksi viallinen istukan kehitys ja fysiologia ovat ominaista häiriintyneelle leimautumiselle. (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Nämä varhaiseen sikiönkehitykseen vaikuttavien prosessien häiriöt voivat johtaa pahimmillaan keskenmenoon.

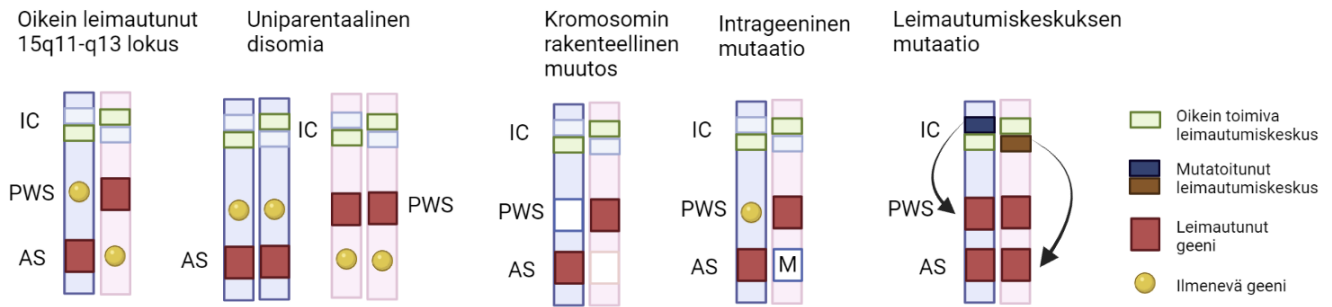
Synnytyksen jälkeen ilmenevissä leimautuneissa geeneissä tapahtuvat mutaatiot johtavat leimautumisen häiriöistä johtuvien sairauksien syntyyn. Koska istukan jälkeen aivot ovat yksi yleisimpiä leimautuneiden geenien ilmentäjiä, ovat ID:t usein neuropsykiatrisia häiriöitä. Lisäksi leimautumisen häiriöiden on todettu aiheuttavan mm. autismia ja kaksisuuntaista mielialanhäiriötä. (Wilkins 2008). Seuraavaksi esitellään tunnetuimpien leimautumisen häiriöistä johtuvien sairauksien patogeneesiä.

## 3.3 Leimautumisen häiriöistä johtuvat sairaudet

Leimautumisen häiriöistä johtuvat sairaudet ovat joukko synnynnäisiä sairauksia, joille on ominaista päällekkäiset kasvuun vaikuttavat kliiniset piirteet. (Eggermann ym. 2015). Yleisimmät kaikista ihmisellä todetuista 12:sta leimautumisen häiriöistä johtuvista sairauksista ovat Prader-Willin-oireyhtymä (PWS), Angelmanin oireyhtymä (AS), Russell-Silverin oireyhtymä (RSS) sekä Beckwith-Wiedemannin oireyhtymä (BWS). Niiden patogeneesi on tarkemmin selvitetty, kuin välttämättä muiden ID:iden (Soellner ym. 2017). Sairauksiin johtavia reittejä on kuitenkin useampia, eikä patogeneesi ole kaikkien tapauksien kohdalla aina selkeä, yksiselitteinen, tai ylipäättään selvitetävissä.

Prader-Willin- ja Angelmanin oireyhtymiä aiheuttavat geenit löytyvät kromosomista 15, tarkemmin alueelta 15q11-q13, joissa tapahtuva leimautumisen häiriö on oireyhtymän aiheuttaja. Alueelta löytyy useita vanhemman sukupuolen mukaan eri tavoin leimautuneita geenejä. Oireyhtymille on yhteistä tietyltä vanhemmalta perityn geenikopio inaktivoituminen. Näin ollen normaalisti vallitsevan yhden alleelin geenituotteen sijaan tuotetta ei synny ollenkaan. Paternaalisesti ilmenevät, häiriössä

inaktiiviset leimautuneet geenit ovat PWS:n tautigeenejä, kuten *SNRPN* ja *SNORD116*, kun taas AS:n tautigeenejä ovat maternalisesti ilmenevät, häiriössä inaktiiviset leimautuneet geenit, kuten *UBE3A*. Syndrooman aiheuttama häiriö alueella voi olla deleetio, uniparentaalinen disomia, leimautumiskeskuksen mutaatio tai intrageeninen mutaatio (kuva 5). Häiriöt ovat yleensä sporadisia. Yleisiä PWS oireita ovat mm. hidastunut kehitys, oppimisvaikeudet, lyhytkasvuisuus ja ylensyönti, ja AS:n oireita ovat mm. henkinen kehitysvammaisuus, neurologiset häiriöt sekä ataksia, eli tahdonalaisten liikkeiden koordinaation häiriöt. (Aittomäki ym. 2016, s. 63-65)



**Kuva 5. Prader-Willin-oireyhtymän ja Angelmanin oireyhtymän patogeneesi. Sama oireyhtymä voi syntyä useampaa reittiä pitkin. PWS:n ja AS:n syntymekanismeina voi olla uniparentaalinen disomia, deleetio tai leimautumiskeskuksen mutaatio, AS:n syntymekanismina näiden lisäksi vielä intrageeninen mutaatio. Leimautumiskeskuksen mutaatioissa kromosomissa aktivoituu leimautumiskeskus, jonka ei kuuluisi olla aktiivinen. Aktivoitunut ICR aiheuttaa kromosomissa väärän geenin leimautumisen. Lopputulos on kuitenkin aina sama. Tehty BioRenderillä, muokattu lähteestä (Aittomäki ym. 2016, s. 64).**

Russell-Silverin- ja Beckwith-Wiedemannin oireyhtymää aiheuttaa mutaatiot kromosomissa 11, kohdassa 11p15.5, jossa sijaitsevat ensimmäisenä leimautuneiksi määritetyt geenit *H19* ja *IGF2* ja useita muita leimautuneita geenejä. Alueen leimautumista säätelee kaksi leimautumiskeskusta, joista toinen säätelee geenien *IGF2* ja *H19* leimautumista. Kaavakuva alueesta löytyy kohdasta 2.2. RSS voi aiheutua alueen paternaalisen kromosomin hypometylaatiosta, maternaalisen kromosomin uniparentaalisesta disomiasta tai maternaalisista duplikaatioista, jotka johtavat *IGF2*-geenin ilmentymisen vähentymiseen ja *H19*-geenin ilmentymisen lisääntymiseen. Tämä johtaa RSS:n tyyppilliseen oirekuvaan, joka on pre- ja postnataalinen pienikasvuisuus. Beckwith-Wiedemannin oireyhtymää aiheuttaa alueen paternaalinen UPD ja sitä kautta leimautumisen häviäminen ja oireena on suurikasvuisuus (Aittomäki ym. 2016, s. 66).

On tutkittu, että tietyille sairauksille on yleisintä jokin tietty sairauteen johtava mutaatio, vaikka sairaus voi puhjeta eri reittejä pitkin. Kuitenkin on useita tapauksia, joissa patogeneesi ei ole selvä. Yksi leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin johtavista reiteistä on havaittu olevan hedelmöityshoidot. Syitä ja seurauksia käydään läpi tarkemmin seuraavassa kappaleessa.

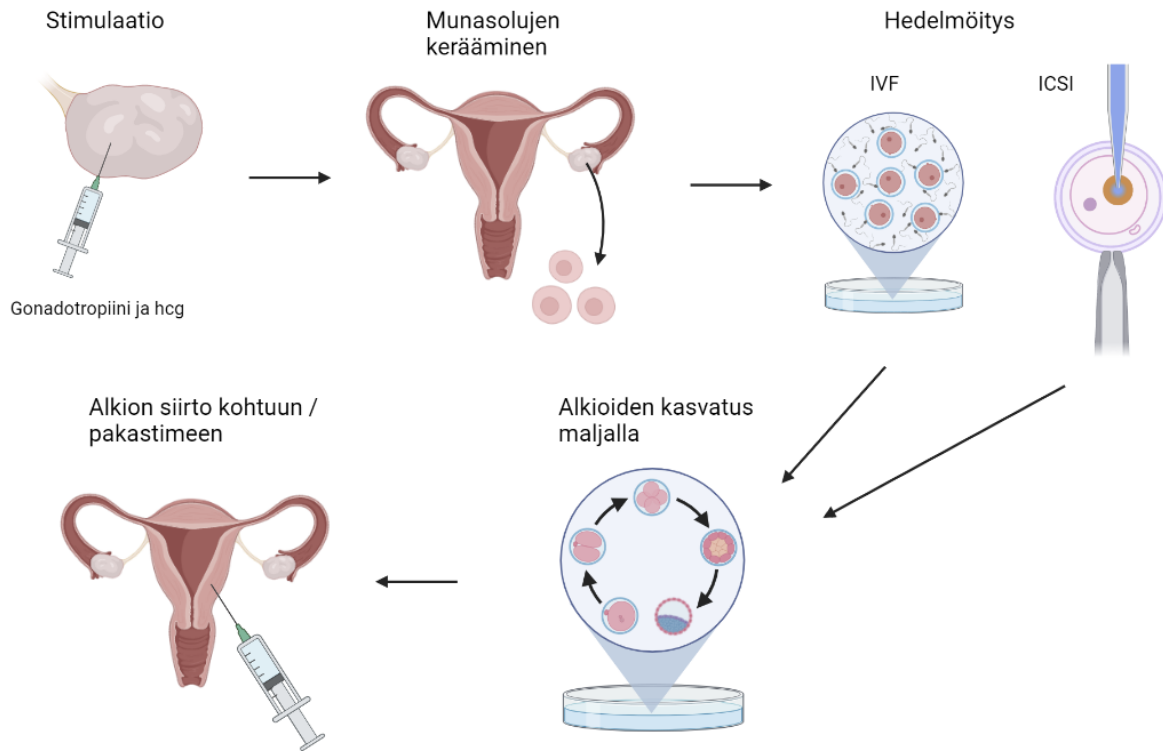
## 4. HEDELMÖITYSHOIDOT JA LEIMAUTUMINEN

Varhainen alkionkehitys on epigeneettisen uudelleenohjelmoitumisen aikaa. Leimat syntyvät jo alkuitusoluissa ja säilyvät hedelmöityshetken jälkeisen demetylaatioaallon yli. Keinohedelmöityksessä, jossa hedelmöitys tapahtuu kohdun ulkopuolella, on erilaiset hedelmöityshetken olosuhteet kohtuun verrattuna. Koska tämä on kriittistä aikaa epigenomin muokkauksen ja leimojen säilymisen kannalta, hedelmöityshetken olosuhteilla voi olla vaikutus leimojen syntyyn ja pysyvyyteen. On paljon todisteita siitä, että alkioiden manipulointi ja luonnollisesta poikkeavat olosuhteet hedelmöityksen kriittisenä ajanjaksona voivat altistaa alkion epigeneettisille muutoksille ja vaikuttaa siten syntyvän lapsen fenotyyppiin. (Hiura 2014). Koska DNA:n metylaatio on epigeneettinen mekanismi, joka saa aikaan geenien leimautumisen, on koeputkihedelmöityksen vaikutusta metylaatioiden syntyyn ja ylläpysymiseen tutkittu enemmän kuin muita epigeneettisiä prosesseja.

Tässä kappaleessa käydään läpi leimautumiseen mahdollisesti vaikuttavia hedelmöitystekniikoita ja kuinka niiden olosuhteet eroavat spontaanista hedelmöityshetkestä. Selvitetään lisäksi, onko näyttöä siitä, että koeputkihedelmöityksellä alkunsa saaneet lapset sairastaisivat ID:itä useammin kuin spontaanisti alkunsa saaneet lapset. Koska hedelmöityshoidot ovat tärkeä ja koko ajan kasvava hoitomuoto hedelmättömille, lisääntymisiässä oleville ihmisille, on tärkeä tiedostaa myös tekniikan mahdolliset riskit (Henningsen ym. 2020). Koska geneettisen leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia on useita, tutkitaan tässä työssä niistä yleisimpien korrelaatiota koeputkihedelmöityksen kanssa. Yleisimmillä tarkoitetaan PWS:ää, AS:ää, RSS:ää ja BWS:ää.

### 4.1 Hedelmöityshoidot

Hedelmöityshoidoista koeputkihedelmöityshoidot jakautuvat perinteiseen IVF-hoitoon (engl. *In Vitro Fertilisation*, IVF) ja mikro- eli ICSI-koeputkihedelmöityshoitoon (engl. *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*, ICSI). Koeputkihedelmöityshoidot ovat lapsettomuushoitoja, joissa munasarjojen hormonaalisella stimuloinnilla ne saadaan tuottamaan useita munasoluja, jotka kerätään munarakuloista ja hedelmöitetään siittiöillä laboratorio-olosuhteissa. Alkioita kasvatetaan keskimäärin 2-6 päivää, jonka jälkeen paras siirretään kohtuun ja loput pakastetaan seuraavia kiertoja varten. IVF-koeputkihedelmöityshoidoissa siittiöt hakeutuvat munasoluihin maljalla itsenäisesti. ICSI-koeputkihedelmöityshoidosta puhutaan, kun hedelmöitymistä autetaan injektoimalla yksi siittiö kerättyyn, kypsään munasoluun lasineulan avulla. (Ovumia. <https://www.ovumia.fi/koeputkihedelmöityshoidot/>. Viitattu: 24.4.2022) (Kuva 6)



**Kuva 6.** Koeputkihedelmöityksen vaiheet. Tehty BioRenderillä.

Mikrohedelmöitystä käytetään, kun siittiöiden lukumäärä on matala tai niiden liikkuvuus alentunut (Ovumia. <https://www.ovumia.fi/koeputkihedelmoityshoidot/>. Viitattu: 24.4.2022). ICSI-hoitoja koskee erityinen huoli tulevan lapsen terveyttä kohtaan, koska menetelmässä ohitetaan luonnollinen siittiövalinta (Kaartinen & Tinkanen 2017). Muita lapsettomuushoitokeinoja ovat mm. inseminaatio, ovulaation induktio, sulusolujen lahjoitus tai alkiopakastushoidot. (Ovumia. <https://www.ovumia.fi/koeputkihedelmoityshoidot/>. Viitattu: 24.4.2022). Näissä ei kuitenkaan ole samanlaista riskiä leimautumisen häiriölle, koska hedelmöitys ei tapahdu kohdun ulkopuolella. Jo hedelmöityshoitojen alkuajoista on oltu huolissaan siitä, vaikuttavatko hoidoissa käytetyt tekniikat mahdollisesti jälkeläisen terveyteen (Henningsen 2020). Yleisesti on voitu todeta, että verrattuna spontaanisti hedelmöitettyihin lapsiin, IVF ja MCSI-hoidoilla hedelmöitetty lapset syntyvät usein ennenaikaisina, pienikokoisempina, heillä on suurentunut perinataalivaiheen komplikaatioriski ja enemmän rakennepoikkeavuuksia (Kaartinen & Tinkanen 2017).

## 4.2 Hedelmöitysympäristön vaikutus epigenomiin

Epigenomin uudelleenohjelmoinnissa epigenomissa tapahtuu paljon muutoksia, kuten metylaatioiden poistoa ja lisäämistä (Zeng & Chen 2019). Siksi hedelmöitysympäristön olosuhteet ja se, kauanko alkio hedelmöityshetkellä on maljalla, voivat vaikuttaa metylaatioiden muodostumiseen ja siten alkion epigenomiin ja leimojen syntyyn. Tekniikoiden ei kuitenkaan odoteta vaikuttavan kromosomin rakenteisiin tai aiheuttavan pistemutaatioita. (Henningsen ym. 2020)

Hedelmöityshoidot voivat vaikuttaa monin tavoin uuden alkion epigenomiin. Hiura ym. (2014) ovat listanneet useita eri tapoja, kuinka hedelmöityshoidot voivat vaikuttaa ihmisen sukusoluihin ja kehittyvään alkioon. Siinä on todettu, että myös munasolujen hormonaalinen stimulointi, kasvatuksen säilyttäminen, kasvatusmedia ja aika, jonka alkio viettää maljalla ennen siirtoa kohtuun, vaikuttavat kaikki leimojen oikeanlaiseen syntymiseen ja ylläpitämiseen kehittyvässä epigenomissa. (Hiura 2014). Hedelmöityshoitojen vaikutus kerättäviin sukusoluihin on kuitenkin kumottu (Ménézo ja Elder, 2020), ja nykyään uskotaan siihen, että kasvatusalustan olosuhteilla on suurempi vaikutus alkion kehittyvään epigenomiin kuin sukusolujen keräämisvaiheella. Tätä tukee myös vuonna 2015 tehty tutkimus, jossa todettiin, että koeputkihedelmöityksessä syntyneet metylaatioerot spontaanisti hedelmöitettyihin lapsiin liittyvät nimenomaan hedelmöityshoitoihin eikä vanhemmalla lapsettomuutta aiheuttaneeseen syyhyn. (Song ym. 2015).

Epigeneettiset poikkeavuudet koeputkihedelmöityksiin liittyen on yhdistetty nimenomaan hedelmöityshetkeen ja ajallisesti sen välittömään läheisyyteen, eikä esimerkiksi sukusolujen keräämisen tai manipuloinnin aiheuttamiin muutoksiin. (Ménézo ja Elder, 2020). Tämä johtuu siitä, että hedelmöityshoitojen on huomattu vaikuttavan alkion epigenomiin, joka on rajun muokkauksen alla juuri hedelmöityshetken jälkeen. Hedelmöityshoidoissa käytettävän kasvatusmedian yhteys alkion poikkeavuuksien syyksi ilmaistiin ensimmäistä kertaa vuonna 2003 (Edwards 2003; Ménézo & Elder, 2020). Aihetta on sen jälkeen tutkittu syvemmin ja huomattu kasvatusmedian vaikuttavan juuri hedelmöityshetken jälkeen tapahtuvaan epigenomin uudelleenohjelmointiin. Useat koeputkihedelmöityksen vaiheet voivat vaikuttaa epigenomiin tai altistaa epigenomin mutaatioille. Tällaisia tekijöitä ovat esimerkiksi kasvatusmedian sisältämät välttämättömät aminohapot (engl. *essential amino acids*), tai alkion solujen maljalla kohtaama oksidatiivinen stressi. (Ménézo ja Elder, 2020)

Metylaation kannalta välttämättömiin aminohappoihin kuuluu esimerkiksi metioniini, joka toimii metylaation kofaktorina. Ihmisalkio on kykenevä saamaan metioniinia ympäristöstään, jos sitä vain siellä on. Metioniini on kuitenkin yleensä poistettu kasvatusalustoilta, koska välttämättömien aminohappojen, kuten metioniinin, läsnäolo maljoilla lisää ammoniakkin tuotantoa maljalla. Ammoniakki on alkion myrkyllistä. Ammoniakkia poistetaan maljoilta eri tavoin. Myös metyyli transferaasien erilainen läsnäolo maljalla verrattuna spontaaneihin olosuhteisiin voi vaikuttaa metylaatioiden muodostumiseen. (Ménézo ja Elder, 2020)

Oksidatiivinen stressi tarkoittaa solun aineenvaihduntareaktion tuottamien reaktiivisia happiyhdisteiden aiheuttamaa haittavaikutusta, oksidatiivisia vaurioita. IVF-hoidoissa käytetty elatusaine muodostaa spontaanisti vapaita radikaaleja inkuboinnin aikana, eikä maljoilla ole suoja radikaaleja vastaan. Vapaat happiradikaalit voivat johtaa hydroksimetyyliytosiinin muodostumiseen. Hydroksimetyyliytosiini kiihdyttää tarpeettomia ja epänormaaleja demetylaatioprosesseja, saaden aikaan leimautumisen kannalta tärkeiden CpG-saarekkeiden demetylaatiota. Metioniinin vähäinen määrä lisää mitokondrioiden oksidatiivista stressiä. Oksidatiivinen stressi aiheuttaa demetylaation

lisäksi myös vaurioita DNA:han. Vaikka alkiolla on DNA:n korjausmekanismit, eivät ne ole yhtä hienostuneet kuin aikuisen ihmisen, jolloin alkio on alttiimpi pysyville vaurioille. (Ménézo ja Elder, 2020). Myös hedelmöityshoidon tyyppi vaikuttaa epigenomin riskiin altistua epimutaatioille. Alkiolla on ICSI-hoidoissa todetusti suurempi riski epimutaatioihin kuin IVF-hoidoissa. (Henningsen ym. 2020). Hedelmöityshoitojen vaikutus alkion epigenomiin ei kuitenkaan ole yleisesti tunnustettu. Osa tuoreista tutkimuksista (Kleijkers ym. 2016; Ji ym. 2018) eivät löydä yhteyttä hedelmöityshoitojen ja metylaatioihin vaikuttavien epimutaatioiden välillä.

### **4.3 Hedelmöityshoitojen yhteys leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin**

Useat tutkimukset ovat selvittäneet koeputkihedelmöitysten vaikutusta ID:iden syntyyn ympäri maailmaa. Pohjoismainen tuore tutkimus (Henningsen ym. 2020) on selvittänyt Suomessa ja Tanskassa vuosina 1990-2014 syntyneiden lasten riskiä sairastua ID:ihin. Sairastumisen riski ei kasvanut ajan saatossa. Kuitenkin BWS:n riski hedelmöityshoidoissa alkunsa saaneiden lasten keskuudessa oli suurempi kuin spontaanisti hedelmöitettyillä lapsilla. Tutkimuksessa ei löydetty yhteyttä hedelmöityshoitojen ja muiden ID:iden välillä. Tämän tutkimuksen mukaan BWS:n riski nousi koeputkihedelmöitysten myötä, mutta muiden ID:iden riski ei noussut. (Henningsen ym. 2020)

Vuonna 2018 suoritettu tutkimus IVF-hoitojen ja ID:iden yhteydestä Yhdysvalloissa (Johnson ym. 2018) antoi vastaavia tuloksia kuin Henningsenin ym. (2020) tutkimus. Sen mukaan IVF-hoidot lisäävät nimenomaan BWS:n riskiä. Aihetta on tutkittu myös Italiassa vuonna 2017 (Mussa ym. 2017). Tämä, edellisiä hieman suppeampi tutkimus tukee edellisiä siinä, että hedelmöityshoidot kasvattavat nimenomaan BWS:n riskiä. Laaja japanilainen tutkimus hedelmöityshoitojen ja ID:iden yhteydestä (Hattori ym., 2019) totesi yhteyden hedelmöityshoitojen ja BWS:n sekä RSS:n välillä.

Jos jotkin ID:t liitetään useammin hedelmöityshoitoihin, voi olla, että kyseiset lokukset ovat alttiimpia ulkoisista syistä aiheutuville muutoksille kuin toiset. Tutkimuksissa ehdotetaan, että hedelmöityshoidot heikentävät joko leimojen syntyä tai niiden ylläpitämistä BWS:lle tyypillisellä alueella 11p15.5. Tämä johtuu siitä, että koeputkihedelmöityksen olosuhteet ovat herkempiä poistamaan kuin lisäämään leimoja, ja BWS syntyi leimautumisen häviämisen mekanismilla. Se, kuinka herkkä tietty alue on epigeneettisille muutoksille, riippuu alueen aktiivisuudesta. Esimerkiksi BWS aiheutuu mutaatioista alueilla, joiden geenit vaikuttavat varhaiseen alkionkehitykseen. Näitä alueita luetaan ja käytetään varhain, joten ne eivät ole samalla tavalla pakkautuneena suojassa kuin toiset, aivojen toimintaan tai käyttäytymiseen vaikuttavat geenit. Tämä altistaa varhaiseen kasvuun ja kehitykseen vaikuttavia geneejiä mutaatioille hedelmöityshoitojen yhteydessä. (Henningsen ym. 2020)

PWS:n ja AS:n tautigeenit eivät suoranaisesti vaikuta varhaiseen alkionkehitykseen, joten niiden uskotaan olevan hedelmöityksen aikana ja sen jälkeisinä päivinä pakkautuneempina ja siten paremmin suojassa kuin BWS:n tautigeenit. PWS:n ja AS:n syntyyn vaikuttaa tutkimusten mukaan



enemmän äidin ikä kuin hedelmöityshoidoissa käytetty tekniikka. (Henningsen ym. 2020). Ikä lisää kromosomin rakennemutaatioiden riskiä.

Globaalissa tutkimuksessa on kuitenkin joitain merkittäviä ongelmia. Eräs ongelma tutkimuksia vertaillaessa on rakennepoikkeavuuden luokittelu. Kaikissa tutkimuksissa ei ole määritelty kriteerejä rakennepoikkeavuudelle, jolloin tulosten vertailukelpoisuutta voi kyseenalaistaa. Lisäksi kyseessä on harvinaiset syndroomat, joita esiintyy väestössä vähän. Keskimäärin 1-10 vastasyntynyttä 100 000:sta sairastuu leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin (Henningsen ym. 2020). Tästä joukosta hyvin pieni osa on saanut alkunsa hedelmöityshoitojen avulla, joten laajaa aineistoa ja tutkimusdataa ei ole saatavilla, jotta voitaisiin varmaksi osoittaa ID:iden lisääntyneen koeputki-hedelmöityksen seurauksena.

Ensimmäinen koeputkilapsi syntyi vuonna 1978, joten tutkimustietoa pitkällä aikavälillä koeputki-hedelmöityslasten terveydestä ei ole vielä saatavilla. Kaikki tutkimukset eivät myöskään kerro, mitä hedelmöityshoitokeinoa on milloinkin käytetty. Tämä lisää haastetta saada vertailukelpoisia tuloksia aiheesta ympäri maailmaa. Koska oireiden kirjo on laaja, sairaus voidaan varmasti diagnosoida vasta muutaman vuoden kuluttua syntymästä. (Henningsen ym. 2020). Vaikka hedelmöityshoitoilla alkunsa saaneilla lapsilla on hyvin vähän suurempi todennäköisyys sairastua BWS:ään kuin spontaanisti hedelmöitettyillä lapsilla, olisi siihen johtavat syyt hyvä selvittää ja riski pystyä pienentämään entisestään. Hedelmöityshoitojen tulisi ennen kaikkea varmistaa sekä tulevan äidin että syntyvän lapsen turvallisuus.

## 5. YHTEENVETO

Geneettisesti leimautuneiden geenien vastinalleelit ilmenevät eri tavoin riippuen siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peritty. Tiedetyt geenit hiljennetään miehen ja tiedetyt geenit hiljennetään naisen alkutiusoluissa. Leimautuminen on eri epigeneettisten säätelyjärjestelmien, metylaatioiden, histonimodifikaatioiden ja ei-koodaavien RNA:iden, tarkkaan säädelyä yhteistyötä. Näillä keinoilla useat yksilön varhaiseen kehitykseen, kuten istukan ja alkion kehitykseen, vaikuttavat geenit toimivat niin, että kehitys on tasapainoista.

Joissain tapauksissa leimautuminen voi häiriytyä. Leimautumisen häiriöt ovat kromosomin rakenteeseen tai leiman syntymiseen tai ilmenemiseen vaikuttavia tekijöitä, joiden vuoksi leimautuminen ei toimi kuten sen kuuluisi. Häiriöiden seurauksena geeni hiljenee kokonaan tai yli-ilmenee molemmilta vanhemmilta, aiheuttaen yleensä ongelmia häiriötä kantavalle yksilölle. Lähtökohtaisesti leimautumisen häiriöt aiheuttavat yksilölle ongelmia jo varhaisessa kehityksessä, johtuen keskenmenoihin tai leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin.

Yleisimpiä leimautumisen häiriöistä johtuvia sairauksia ihmisellä ovat Prader-Willin oireyhtymä, Angelmanin oireyhtymä, Russell-Silverin oireyhtymä ja Beckwith-Wiedemannin oireyhtymä. Oireyhtymät voivat syntyä montaa eri reittiä, mutta niitä yhdistää leimautuneiden geenien epätasapainoinen ilmeneminen, joka johtaa sairauksille tyypillisiin oireisiin, kuten kehitys- ja kasvuhäiriöihin. Kaikkien ID-tapausten patogeneesi ei aina selviä. Yksi sairauksiin johtava reitti saattaa olla hedelmöityshoidot ja hoitojen olosuhteiden vaikutus alkion kehittyvään epigenomiin.

Hedelmöityshoitojen pitkä historia ja kehittynyt tekniikka ovat johtaneet hoitojen yleistymiseen. Hedelmöityshoitomuodoista niiden hoitojen, joissa hedelmöitys tapahtuu kohdun ulkopuolella (IVF- ja ICSI-hoidot) on kuitenkin havaittu vaikuttavan alkion kehittyvään epigenomiin. Hedelmöityshetken ja sen jälkeisten hetkien ollessa epigenomin uudelleenohjelmoinnin aikaa, on epigenomi tällöin altis ei-toivotuille muutoksille. Kasvatusmaljan media eroaa huomattavasti spontaanin hedelmöityksen ympäristöstä, ja aiheuttaa sitä kautta riskejä epigenomin muodostukselle. Epigenomin ohjelmointia, eli tuolloin syntyviä metylaatioita ja histonimodifikaatioita, vaarantaa hedelmöityshoitojen ympäristön oksidatiivinen stressi, kriittisten aminohappojen ja entsyymien puute ja alkion näissä olosuhteissa viettämä aika ennen siirtoa kohtuun.

Tunnetuimmista ID:istä BWS:n riskin on todettu kasvavan hedelmöityshoitojen yhteydessä. Kaikki leimautumisen häiriötä aiheuttavat syyt tai häiriöiden syntyhetki eivät ole vielä selvillä. Tulee muistaa, että koeputkihedelmöitysten ollessa suhteellisen tuore hoitomuoto ja ID:iden ollessa erittäin harvinaisia sairauksia tarvitaan vielä paljon lisää tutkimusta, jotta voitaisiin varmaksi sanoa hedelmöityshoitojen kasvattavan ID:iden riskiä.

# LÄHTEET

- Aittomäki, K., Moilanen, J., Perola, M., & Aarnisalo, A. A. (2016). *Lääketieteellinen genetiikka*. Kustannus Oy Duodecim, s. 63–66, 68, 80–88, 135–143.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Essential Cell Biology* (3. painos). Garland Science, s. 287-288.
- Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 6 (2), a018382–a018382. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>
- Bartolomei, M., & Ferguson-Smith, A. (2011). Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 (7), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002592>
- Edwards RG, Ludwig M. (2003). Are major defects in children conceived in vitro due to innate problems in patients or to induced genetic damage? *Reproductive biomedicine online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61742-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61742-7)
- Eggermann, T., Perez de Nanclares, G., Maher, E. R., Temple, I. K., Tümer, Z., Monk, D., Mackay, D. J., Grønskov, K., Riccio, A., Linglart, A., & Netchine, I. (2015). Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clinical epigenetics*, 7, 123. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0143-8>
- Geneimprint. (2012). *Imprinted Genes: by Species*. Saatavissa (viitattu 4.3.2022): <https://www.geneimprint.com/site/home>
- Hattori, H. et al. (2019). Association of four imprinting disorders and ART. *Clinical epigenetics*. 11 (1), 21–21. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0623-3>
- Henningsen, A. A. et al. (2020). Imprinting disorders in children born after ART: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Human reproduction* (Oxford). 35 (5), 1178–1184. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa039>
- Hiura, H. et al. (2014). Imprinting methylation errors in ART. *Reproductive medicine and biology*. 13 (4), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s12522-014-0183-3>
- Horsthemke, B. (2014). In Brief: Genomic Imprinting and Imprinting Diseases. *The Journal of pathology* 232 (5), 485–487. <https://doi.org/10.1002/path.4326>
- John, R. M. (2017). Imprinted genes and the regulation of placental endocrine function: Pregnancy and beyond. *Placenta* (Eastbourne). 5686–90. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.099>

- Johnson, J. P. et al. (2018). Overrepresentation of pregnancies conceived by artificial reproductive technology in prenatally identified fetuses with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 35 (6), 985–992. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1228-z>
- Ji, M. et al. (2018). ART manipulation after controlled ovarian stimulation may not increase the risk of abnormal expression and DNA methylation at some CpG sites of H19, IGF2 and SNRPN in fetuses: A pilot study. *Reproductive biology and endocrinology*. 16 (1), 63–63. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0344-z>
- Kaartinen, N. & Tinkanen, H. (2017). Syntyykö koeputkihedelmöityshoidoilla terveitä lapsia? Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. Saatavissa (viitattu 14.4.2022): <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2017/8/duo13681>.
- Kim, S. et al. (2015). CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & molecular medicine*. 47 (6), e166–e166. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.33>
- Kleijkers, S. H. M. et al. (2016). Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Human reproduction (Oxford)*. 31 (10), 2219–2230. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew156>
- Lewis, A. & Reik, W. (2006). How imprinting centres work. *Cytogenetic and genome research*. 113 (1-4), 81–89. <https://doi.org/10.1159/000090818>
- Li, X. et al. (2017). Uniparental disomy and prenatal phenotype: Two case reports and review. *Medicine (Baltimore)*. 96 (45), e8474–e8474. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008474>
- Ménézo, Y. & Elder, K. (2020). Epigenetic remodeling of chromatin in human ART: addressing deficiencies in culture media. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 37 (8), 1781–1788. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01884-6>
- MedicinePlus. (2021). H19 gene. IGR2 gene. Saatavissa (viitattu 14.4.2022): <https://medlineplus.gov/genetics/gene/>
- Mussa, A. et al. (2017). Assisted reproductive techniques and risk of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatrics (Evanston)*. 140 (1) <https://doi.org/10.1542/peds.2016-4311>
- Ovumia. (2021) Koeputkihedelmöityshoidot (IVF & ICSI). Saatavissa (viitattu 24.4.2022): <https://www.ovumia.fi/koeputkihedelmöityshoidot/>
- Renfree, M. B. et al. (2009). Evolution of genomic imprinting: Insights from marsupials and monotremes. *Annual review of genomics and human genetics*. 10 (1), 241–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150026>
- Soellner, L. et al. (2017). Recent Advances in Imprinting Disorders. *Clinical genetics* 91 (1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/cge.12827>

Song, S. et al. (2015). DNA methylation differences between in vitro-and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clinical epigenetics*. 7 (1), 41–41. [https://doi.org/ 10.1186/s13148-015-0071-7](https://doi.org/10.1186/s13148-015-0071-7)

Statello, L., Guo, C.J., Chen, LL. et al. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 22 (2), 96–118. [https://doi.org/ 10.1038/s41580-020-00315-9](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9)

Tycko, B. & Morison, I. M. (2002). Physiological functions of imprinted genes. *Journal of cellular physiology*. 192 (3), 245–258. [https://doi.org/ 10.1002/jcp.10129](https://doi.org/10.1002/jcp.10129)

Wilkins, J. F. (2008). *Genomic Imprinting* (1. painos). New York, NY: Springer New York.

Zeng, Y., & Chen, T. (2019). DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*, 10 (4), 257–. <https://doi.org/10.3390/genes10040257>